

# 应用 RAPD 技术研究 4 种鲍的亲缘关系\*

黎中宝

(集美大学水产学院 厦门 361021)

**摘要** 应用 RAPD 技术研究 4 种鲍的亲缘关系结果表明,4 种鲍群体中 20 个有效引物共扩增出 538 条 DNA 带,平均每个引物扩增的条带数为 26.9;扩增的多态性条带数 136,平均每个引物扩增的多态性条带数为 6.8;多态位点百分数为 25.3%。盘鲍群体和皱纹盘鲍群体之间遗传距离与遗传一致度分别为 0.28 和 0.72,杂色鲍群体和九孔鲍群体之间遗传距离与遗传一致度分别为 0.32 和 0.68。聚类分析把盘鲍群体和皱纹盘鲍群体聚为 1 组,二者亲缘关系较近;杂色鲍群体和九孔鲍群体聚为 1 组,二者亲缘关系也较近。

**关键词** 盘鲍 皱纹盘鲍 杂色鲍 九孔鲍 RAPD 亲缘关系

**Study on genetic relationship among 4 kinds of abalone using RAPD technique.** LI Zhong-Bao(School of Fisheries, Jimei University, Xiamen 361021), *CJEA*, 2004, 12(4): 60~63

**Abstract** RAPD technique is used to study the genetic relationship among 4 kinds of abalone. The results show that total 538 DNA bands are scored by 20 effective primers in 4 kinds of abalone, of which 136 DNA bands are reproducibly polymorphic, and the percentage of polymorphic products is 25.3%; the genetic distance and genetic identity between *Haliotis discus discus* and *H. discus hannai* are 0.28, 0.72 respectively, those between *H. diversicolor diversicolor* and *H. diversicolor supertexta* are 0.32, 0.68 respectively. In the results of cluster analysis, *H. discus discus* and *H. discus hannai* are pooled into one group, they both are genetically closer; *H. diversicolor diversicolor* and *H. diversicolor supertexta* are pooled into another group, they both also are genetically closer.

**Key words** *Haliotis discus discus*, *H. discus hannai*, *H. diversicolor diversicolor*, *H. diversicolor supertexta*, Random amplified polymorphic DNA (RAPD), Genetic relationship

盘鲍(*Haliotis discus discus*)、皱纹盘鲍(*H. discus hannai*)、杂色鲍(*H. diversicolor diversicolor*)和九孔鲍(*H. diversicolor supertexta*)属软体动物门,腹足纲,前鳃亚纲,原始腹足目,鲍科,鲍属。这 4 种鲍为我国海珍品养殖重要种类,具有较高的经济价值,其养殖业发展迅速。杂色鲍和九孔鲍在形态和生态上非常相似,盘鲍和皱纹盘鲍在形态和生态上也非常相似,它们的分类地位目前尚不清晰,这给其养殖学、遗传学和育种学的研究带来一定困难,故研究它们的分类地位十分必要。RAPD 标记不仅应用于海洋贝类杂种优势的预测<sup>[1-4]</sup>,且应用于其种内与种间不同群体间的种质鉴定、系统进化和遗传多样性与分化<sup>[5-7,10,11]</sup>等方面研究。目前有关应用 RAPD 技术研究这 4 种鲍的亲缘关系尚未见报道。笔者在对盘鲍、皱纹盘鲍、杂色鲍和九孔鲍等位酶的生化遗传分析研究基础上<sup>[8,9]</sup>,又系统研究了它们的遗传多样性和遗传分化、杂合体缺乏及其过量状况以及九孔鲍的遗传结构(2003 年)。本实验采用随机扩增多态 DNA(RAPD)方法,研究了 4 种鲍的亲缘关系,为其种质资源的可持续利用及其保护提供科学依据。

## 1 实验材料与方法

实验于 2002 年在厦门大学海洋与环境学院实验室进行,皱纹盘鲍养殖群体取自山东省荣成,共 36 个,长 3~5cm;盘鲍养殖群体取自福建省东山,共 36 个,长 3~5cm;杂色鲍自然群体取自海南省,共 32 个,长 4~8cm;九孔鲍养殖群体取自福建省东山(1 个群体)和漳浦(3 个群体),每群体各取 32 个,共 128 个,长 4~8cm。所有样品活体(充 O<sub>2</sub>)当天带回实验室于 -80℃ 保存。实验药品为提取缓冲液、20mg/mL 蛋白酶 K、十二烷基硫酸钠(SDS)、20μg/mL RNA 酶、饱和酚、氯仿、异戊醇、3mol/L NaAc、无水乙醇、70%乙醇和盐酸三羟甲基氨基甲烷与乙二胺四乙酸缓冲液(TE)。

\* 国家自然科学基金项目(30231013)和福建省自然科学基金项目(B0110036)共同资助

收稿日期:2003-12-01 改回日期:2003-12-31

基因组 DNA 的提取。每群体分别提取 12 个样品,每个体取足部肌肉约 300mg 液 N 研磨后称取 50mg 于 1.5mL 离心管中,再加入 600 $\mu$ L 提取缓冲液(10mmol/L Tris-Cl, pH8.0;0.1mol/L 乙二醇四乙酸,pH8.0;0.5% 十二烷基硫酸钠;20 $\mu$ g/mL RNaseA),37 $^{\circ}$ C 水浴 1h 后加入 25 $\mu$ L 蛋白酶 K(20mg/mL),50 $^{\circ}$ C 消化过夜,然后以等体积的平衡酚抽提 2 次,再用等体积的酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)抽提 1 次,加入 1/10 体积的 3mol/L NaAc 和 2 倍体积的冰无水乙醇置 -20 $^{\circ}$ C 30min,于 1 万 r/min 离心 5min,用 70% 乙醇洗 DNA 沉淀 2 次,待乙醇挥发干后加入 60 $\mu$ L 盐酸三羟甲基氨基甲烷与乙二醇四乙酸缓冲液(TE)使 DNA 溶解,置 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

RAPD 扩增。RAPD 反应条件按 Williams J. G. K. 等方法<sup>[12]</sup>进行,扩增反应总体积为 25 $\mu$ L,其中包括 10mmol/L Tris-Cl(pH8.0)、50mmol/L KCl、2mmol/L MgCl<sub>2</sub> 和 0.2 $\mu$ mol/L 引物,4 种核苷酸 dCTP、dGTP、dATP 和 dTTP 各 0.2mmol/L,40ng 基因组 DNA,1U(1 个酶活力单位)的 Tag 酶,于 PCR 扩增仪进行反应,其中前 2 个循环为 94 $^{\circ}$ C 变性 3min,36 $^{\circ}$ C 复性 3min,72 $^{\circ}$ C 延伸 3min;后 38 个循环为 94 $^{\circ}$ C 变性 1min,36 $^{\circ}$ C 复性 1min,72 $^{\circ}$ C 延伸 2min;最后 72 $^{\circ}$ C 保温 10min。所用 20 个有效引物及其碱基序列见表 1。扩增产物在 1.4% 琼脂糖凝胶中电泳分离,溴化乙锭染色,紫外检测并记录。

表 1 4 种鲍群体中 20 个有效引物 PCR 扩增结果

Tab.1 Amplification of 20 effective primers among 4 kinds of abalone

引物号 Primer number	碱基序列(5'-3') Sequence	扩增条带数 Number of DNA bands	多态性条带数 Number of poly- morphic bands	多态性条带数占/% Percentage of poly- morphic bands	引物号 Primer number	碱基序列(5'-3') Sequence	扩增条带数 Number of DNA bands	多态性条带数 Number of poly- morphic bands	多态性条带数占/% Percentage of poly- morphic bands
S8	GTCCACACGG	24	6	25.0	S24	AATCGGGCTG	16	4	25.0
S11	GTAGACCCGT	22	6	27.2	S58	GAGAGCCAAC	22	6	27.3
S12	CCTTCACGCA	31	11	35.5	S68	TGGACCGGTG	26	7	26.9
S13	TTCCCCGCT	29	9	31.0	S78	TGAGTGGGTG	35	9	25.7
S14	TCCGCTCTGG	21	7	33.3	S88	TCACGTCCAC	31	12	38.7
S15	GGAGGGTGTT	14	3	21.4	S168	TTTGCCCGGT	32	8	25.0
S16	TTTGCCCGCA	23	4	17.4	S178	TGCCAGCCT	34	7	20.6
S17	AGGGAACGAG	24	5	20.8	S188	TTCAGGTGG	46	8	17.4
S18	CCACAGCAGT	22	5	22.7	S198	CTGGCGAACT	32	8	25.0
S20	GGACCCCTTAC	26	5	19.2	总计		538	136	
S22	TGCCGAGCTG	28	6	21.4	平均		26.9	6.8	25.3

扩增图谱的数据处理。记录电泳后清晰的扩增带,在同一迁移位置按有或无记录,有带的计为 1,无带则记为 0,列出 0、1 矩阵进行统计分析。多态位点百分数是反映群体内遗传多样性水平的重要指标之一,根据下式计算多态位点百分数:

$$P = (k/n) \times 100\% \quad (1)$$

式中, $k$  为多态位点数目, $n$  为所测定位点的总数。根据 Nei M. 等<sup>[13]</sup>公式计算遗传距离和遗传一致度:

$$I = 2N_{xy}/(N_x + N_y) \times 100\% \quad (2)$$

式中, $N_x$  和  $N_y$  指个体或种群 X 和 Y 分别具有的扩增区带数目, $N_{xy}$  指 X 和 Y 共有的扩增区带数目,计算出种群间遗传一致度( $I$ )和遗传距离( $D = 1 - I$ ),根据种群间遗传距离,用 UPGMA<sup>[14]</sup>程序对 4 个鲍群体进行聚类分析。

## 2 结果与分析

引物筛选及扩增结果。从 50 个 10-mer 随机引物中筛选出 20 个有效引物,即 S8、S11、S12、S13、S14、S15、S16、S17、S18、S20、S22、S24、S58、S68、S78、S88、S168、S178、S188 和 S198(见表 1)。4 种鲍群体中 20 个有效引物经过 2~3 次重复共扩增出 538 条 DNA 带,平均每个引物扩增的条带数为 26.9;扩增的多态性条带数 136,平均每个引物扩增的多态性条带数为 6.8;多态位点百分数为 25.3%。引物扩增所得 PCR 指纹图谱见图 1。

遗传一致度与遗传距离及聚类分析。4 种鲍群体之间遗传一致度和遗传距离见表 2。遗传距离变化范围为 0.28~0.46,盘鲍群体和皱纹盘鲍群体之间遗传距离为 0.28,杂色鲍群体和九孔鲍群体之间遗传距离

为0.32。遗传一致度变化范围为0.54~0.72,盘鲍群体和皱纹盘鲍群体之间遗传一致度为0.72,杂色鲍群体和九孔鲍群体之间遗传一致度为0.68。

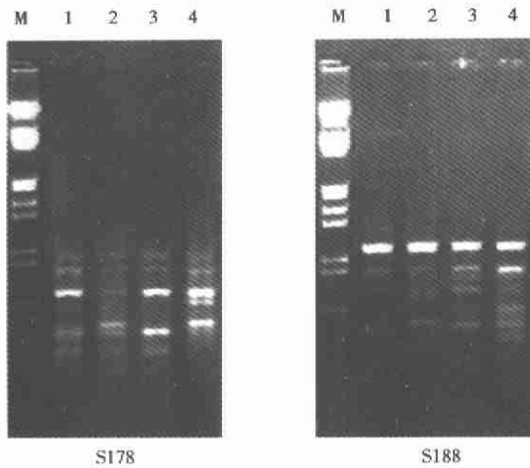


图1 4种鲍DNA指纹图谱\*

Fig.1 Genomic DNA fingerprints among 4 kinds of abalone

\*图中M为标记,1为九孔鲍样品,2为盘鲍样品,3为皱纹盘鲍样品,4为杂色鲍样品。

4种鲍形态与生态的相似性。盘鲍和皱纹盘鲍在形态和生态上非常相似、杂色鲍和九孔鲍在形态和生态上也非常相似,且盘鲍和皱纹盘鲍生化遗传非常相似<sup>[10]</sup>、杂色鲍和九孔鲍生化遗传也非常相似<sup>[11]</sup>。本实验研究表明盘鲍群体和皱纹盘鲍群体之间遗传距离与遗传一

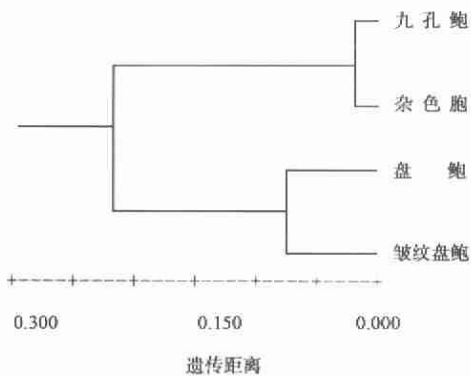


图3 4种鲍群体之间聚类图(用等位酶方法)

Fig.3 The cluster analysis among 4 kinds of abalone (Using allozyme method)

表2 4种鲍群体之间遗传一致度(上三角)与遗传距离(下三角)

Tab.2 Genetic identity (above diagonal) and genetic distance (below diagonal) among 4 kinds of abalone

名称 Types	九孔鲍 <i>H. diversicolor supertexta</i>	盘鲍 <i>H. discus discus</i>	皱纹盘鲍 <i>H. discus hannai</i>	杂色鲍 <i>H. diversicolor diversicolor</i>
九孔鲍	0	0.62	0.58	0.68
盘鲍	0.38	0	0.72	0.61
皱纹盘鲍	0.42	0.28	0	0.54
杂色鲍	0.32	0.39	0.46	0

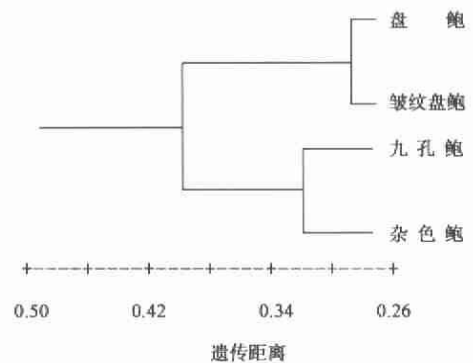


图2 4种鲍群体之间聚类图

Fig.2 The cluster analysis among 4 kinds of abalone

致度分别为0.28和0.72,杂色鲍群体和九孔鲍群体之间遗传距离与遗传一致度分别为0.32和0.68。因鲍鱼或贝类RAPD遗传距离的分类标准尚未建立,故本研究尚不能根据RAPD研究结果来判断4种鲍群体之间差异是否达到种或亚种水平,这将在获得鲍鱼或贝类RAPD遗传距离的分类标准后方可进行。根据群体间遗传距离用UPGMA程序对4种鲍群体进行聚类分析结果表明,聚类分析把盘鲍群体和皱纹盘鲍群体聚为1组,杂色鲍群体和九孔鲍群体聚为1组(见图2),进一步说明在DNA水平上盘鲍和皱纹盘鲍亲缘关系较近,杂色鲍和九孔鲍亲缘关系较近。这与笔者用等位酶方法研究结果基本一致(见图3),同时在DNA水平上也支持笔者等位酶方法的研究结论。在此基础上笔者将对同一批样本进一步展开mtDNA、微卫星分析研究,这对于严格界定4种鲍的分类地位是非常必要的。

### 3 小结与讨论

11个有效引物检测1个皱纹盘鲍人工群体的F1代多态位点百分数为72.37%<sup>[4]</sup>。12个有效引物检测日本盘鲍、皱纹盘鲍及正反杂交后代的多态位点百分数为43.3%<sup>[2]</sup>。22个有效引物检测皱纹盘鲍中国群体和日本群体自交与杂交4个F1家系的多态位点百分数为36.84%~47.37%<sup>[1]</sup>。其他贝类如栉孔扇贝<sup>[3]</sup>、泥蚶<sup>[5]</sup>、牡蛎<sup>[6]</sup>和马氏珠母贝<sup>[7]</sup>等也有类似研究。本研究应用RAPD技术在4种鲍群体中20个有效引物共扩增出538条DNA带,其中扩增的多态性条带数136,多态位点百分数为25.3%,这大于笔者用等位酶方法对同一批样品的研究结果( $P_{0.99} \% = 22.2$ ),其原因用RAPD方法研究基因组DNA所检测出的多态位点不仅包括功能基因,且包括结构基因;而用等位酶方法仅检测出能表达的功能基因中部分基因。由于不同引物扩增的多态位点数目不同,故用RAPD技术评估种群的遗传多样性与实验所用引物和反应条件有关,且与所分析位点的数目和类型有关。另外用不同引物组合扩增的某种群遗传多样性仅能反映基因组其他位点

遗传多样性的相对量。根据种群间遗传一致度和遗传距离,用 UPGMA 程序对 4 种鲍群体进行聚类分析,其结果为盘鲍群体和皱纹盘鲍群体聚为 1 组,杂色鲍群体和九孔鲍群体聚为 1 组。

### 参 考 文 献

- 1 张国范,王继红,赵洪恩等. 皱纹盘鲍中国群体和日本群体的自交与杂交 F1 的 RAPD 标记. 海洋与湖沼,2002,33(5):484~491
- 2 万俊芬,汪小龙,潘 洁等. 日本盘鲍×皱纹盘鲍子代杂种优势的 RAPD 分析. 青岛海洋大学学报,2001,31(4):506~512
- 3 李红蕾,宋林生,刘保忠等. 栉孔扇贝不同种群的遗传结构及其杂种优势. 海洋与湖沼,2002,33(2):188~195
- 4 孙 博,刘 晓,张国范. 一个皱纹盘鲍人工群体内个体大小遗传变异的 RAPD 分析. 海洋科学,2003,27(5):27~30
- 5 李太武,李成华,宋林生等. 5 个泥蚶群体遗传多样性的 RAPD 分析. 生物多样性,2003,11(2):118~124
- 6 刘必谦,戴继勋,喻子牛. RAPD 标记在大连湾牡蛎种群研究中的应用. 青岛海洋大学学报,1998,28(1):82~88
- 7 王爱民,阎 冰,叶 力等. 三个野生种群马氏珠母贝遗传多样性的 RAPD 分析. 农业生物技术学报,2003,11(2):163~168
- 8 黎中宝,邓书林,丁 洋等. 盘鲍和皱纹盘鲍等位酶的生化遗传分析. 海洋科学,2004,28(4):43~49
- 9 黎中宝,田 柱,朱冬蕊等. 九孔鲍和杂色鲍等位酶的生化遗传分析. 海洋科学,2004,28(2):27~31
- 10 Heipel D. A., Bishop J. D. D., Brand A. R., *et al.* Population genetic differentiation of the great scallop *Pecten maxmius* in Western Britain investigated by randomly amplified polymorphic DNA. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 1998,162:163~171
- 11 Orbach E. A., Wilbur A. E., Gaffney P. M., *et al.* RFLP analysis of genetic diversity in a siberian population of the Japanese scallop (*Patinopecten yessoensis*). *J. Shellfish Res.*, 1996,15(2):529
- 12 Williams J. G. K., Kubelik A. R., Livak J., *et al.* DNA polymorphisms identified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.*, 1990,18(22):6531~6535
- 13 Nei M., Li W. H. Mathematical mode for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1979, 76(10):5269~5273
- 14 Sneath P. H. A., Sokal R. R. In *Numerical Taxonomy*. Freeman, San Francisco, 1973

### 欢迎订阅 2005 年《应用与环境生物学报》

《应用与环境生物学报》是由中国科学院成都生物研究所主办、中国科学院科学出版基金资助、科学出版社出版、国内外公开发行的全国性学术期刊,是我国应用生物学和环境生物学的核心刊物。主要报道我国应用生物学、环境生物学及相关科学领域的基础研究、应用基础研究和应用研究的成果,包括研究论文、研究简报和本刊特邀的综述或述评。读者对象主要为本学科的科研人员、大专院校师生和科研管理干部。《应用与环境生物学报》为双月刊,大 16 开本,128 页,全铜版纸印刷,逢双月 25 日出版。国际刊号:ISSN 1006-687X,国内刊号:CN 51-1482/Q,邮发代号:62-15,每期定价 11.00 元,全年 66.00 元,全国各地邮局(所)均可订阅。新订户可直接向本刊编辑部补购 1995、1996、1997、1998、1999、2000、2001 年各卷(卷价分别为 32.00 元、44.00 元、44.00 元、44.00 元、66.00 元、66.00 元和 66.00 元)以及 1999 年增刊(环境微生物学研究,每册 22.00 元),地址:(610041)成都市人民南路 4 段 9 号中国科学院成都生物研究所《应用与环境生物学报》编辑部,电话:(028)85229903,85237341。